РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований по изучению иммунобиологических свойств инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц в производственных условиях.

Установлено, что введение вакцины обеспечивало у привитых кур формирование напряженного иммунитета к специфическим антигенам, входящим в состав препарата, на протяжении всего периода эксплуатации птиц.

SUMMARY

Data on studying immunobiological properties of the inactivated emulsion vaccine against Newcastle disease and avian metapneumovirus infection under production conditions are given in the paper.

It was stated that the vaccine administration provided the induction of strong immunity in inoculated chickens to specific antigens of the preparation during the whole production life of chickens.

Литература

1. Борисова, И.А. Антигенная активность экспериментальной инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц / И.А. Борисова // Вет. патология. 2006. N4 (19). С. 144-146.
2. Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации / З.Б. Хлебовец, А.С. Пронин, И.А. Борисова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных / Владимир, 2007. Т.5. С. 317-325.
3. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных // Владимир, 1998. С. 45-52.
4. Обоснование выбора подтипа метапневмовируса птиц в качестве антигена инактивированной вакцины / А.С. Пронин, Н.И. Герасимова, М.А. Волкова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных/ Владимир, 2006. Т.4. С. 323-328.
5. Серологический мониторинг по птичьему метапневмовирусу (Avian Pneumovirus–APV) в России // Матер. конф. по птицеводству. Звенигород, 2003. С. 222-223.
6. Office International des Epizooties // Report of the meeting of the OIE standards Commission, Paris, OIE. 2000. P. 4.
7. Protection conferred by live avian metapneumovirus and Newcastle disease virus vaccines applied singly or in combination / K. Ganapathy, W.C. Cox, R.E. Gough, P. Cargill, E. Montiel, R.C. Jones // 15th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book (WVPC), China, Beijing. 2007. P. 155.
8. Westbury, H. Commentary. Newcastle disease virus: an evolving pathogen // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 5-11.

УДК 619:616.98:578.831.3:636.52/58

З.Б. Хлебовец, А.Э. Меньщикова, М.Е. Качалова, Л.О. Щербакова, Н.С. Мудрак, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ aMPV/B/2-07

Введение

Метапневмовирус птиц (*Avian Metapneumovirus*, aMPV) – РНК-содержащий вирус, поражающий верхние дыхательные пути птиц. Наиболее подвержены заболеванию индейки и куры, в меньшей степени – фазаны, утки, гуси и некоторые другие виды птиц (10, 11).

Впервые возбудитель метапневмовирусной инфекции был выявлен в 1978 г. в Южной Африке, позднее случаи заболевания стали регистрировать в странах Европы, Азии, Северной и Южной Америки. На основании антигенных и генетических отличий выделены 4 подтипа вируса: A, B, C и D [2, 13, 15, 18]. В Европе и России преобладают метапневмовирусы птиц подтипов А и В.

Клинические признаки метапневмовирусной инфекции птиц непатогномичны и характеризуются, прежде всего, поражением органов респираторного тракта. У заболевших птиц отмечают затрудненное дыхание, чихание, хрипы, кашель, угнетенное состояние, в более тяжелых случаях – выделения из ноздрей и глаз, опухание инфраорбитальных синусов [5, 12]. У кур подобное состояние описано как «синдром опухшей головы», при этом у птицы часто выявляют другие инфекционные агенты как вирусной, так и бактериальной этиологии [5]. В некоторых случаях метапневмовирусная инфекция у кур может протекать бессимптомно, выражаясь лишь в ослаблении иммунитета птиц и увеличении их подверженности другим заболеваниям [3, 5].

Метапневмовирус птиц распространяется при непосредственном контакте здоровой птицы с уже заболевшей, а также через воду, корм, инвентарь и т.д. Попадая

в организм птицы, вирус репродуцируется, главным образом, в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей (носовых полостей, гортани, трахеи) и конъюнктивы. Зарегистрированы случаи выявления вируса в легких и яйцеводах [17]. Период, в течение которого возможно выделение метапневмовируса из респираторных органов и оральных смывов птицы, в среднем составляет 6-8 суток [4, 8, 12, 17, 19]. Вирусоспецифические антитела выявляют в крови инфицированных птиц уже спустя 7 суток после заражения [4, 16].

Для первичной изоляции метапневмовирусов птиц подтипов А и В наиболее подходит трахеальная органная культура [5]. Клетки мерцательного эпителия трахеи являются естественной системой для репродукции полевых изолятов метапневмовируса птиц, соответственно, нет необходимости в предварительной адаптации вируса. Это позволяет сократить время исследования и предотвратить изменение свойств вируса.

Метапневмовирус птиц является представителем сем. *Paramyxoviridae*, однако не обладает гемагглютинирующей и нейраминидазной активностью. Возможно, этим объясняется его меньшая патогенность по сравнению с другими парамиксовирусами, в частности, вирусом ньюкаслской болезни. Экономический ущерб при метапневмовирусной инфекции складывается в основном из таких немаловажных в коммерческом отношении факторов, как повышенная выбраковка некондиционной птицы, снижение прироста живой массы и яичной продуктивности, а также затрат на ликвидацию болезни.

Целью нашей работы являлось изучение биологических свойств метапневмовируса птиц, выделенного у цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Калужской области в 2007 г. Вакцинация птиц против метапневмовирусной инфекции в хозяйстве не проводилась, что позволило предположить циркуляцию полевого изолята вируса. Для достижения поставленной цели были изучены особенности тропизма и персистенции данного изолята вируса, возможность горизонтального распространения инфекции и уровень гуморального иммунного ответа.

Материалы и методы

Вирус. Изолят метапневмовируса птиц подтипа В, выявленный у цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Калужской области в мае 2007 г.

Выделение вируса. Для выделения изолята метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07 использовали трахеальную органную культуру (ТОК). Критерием размножения вируса служила его способность вызывать цилиостаз, т.е. останавливать мерцательное движение эпителиальных клеток трахеи. Срезы трахеи и культуральную жидкость отбирали на 4-5 сутки, когда титры вируса достигали максимальных значений [6]. Часть срезов трахеи из каждого пассажа инкубировали в течение 14 суток для наблюдения проявления цилиостатического действия вируса.

Было проведено 4 последовательных пассажа. Титр вируса после 4 пассажа составил 10^4 $ЦД_{50}$/0,5 мл (где ЦД – цилиостатическая доза).

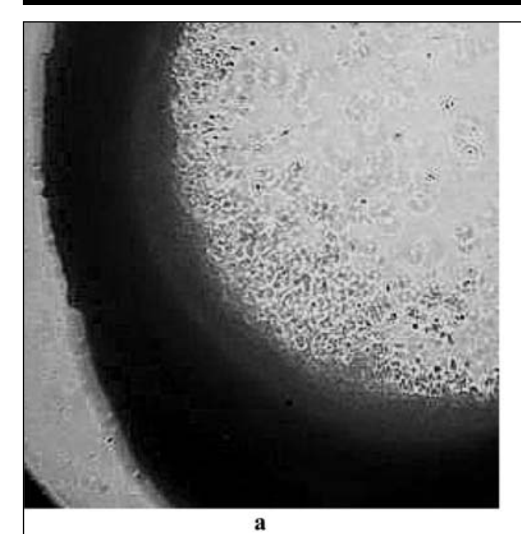
Лабораторные животные. В опытах использовали цыплят, свободных от антител к метапневмовирусу птиц, в возрасте 7 суток.

Для изучения свойств изолята метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07 было поставлено 2 эксперимента.

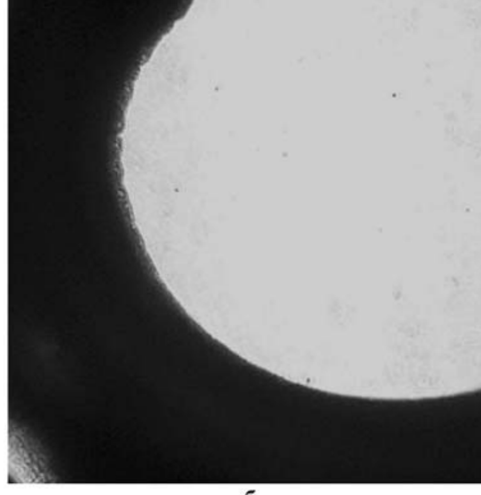
Эксперимент №1. В эксперименте №1 участвовало 3 группы цыплят. Цыплятам опытной группы (7 голов) вводили супернатант ТОК, содержащий изолят метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07, интраназально, орально и в конъюнктивальный мешок в объеме 0,2 мл на цыпленка. Цыплят контактной группы (5 голов) подсаживали к цыплятам опытной группы через 3 часа после инфицирования и содержали в одном боксе на протяжении всего эксперимента. Цыплятам контрольной группы (4 головы) вводили супернатант свободной от вируса ТОК интраназально, орально и в конъюнктивальный мешок в объеме 0,2 мл на цыпленка, содержали отдельно от цыплят опытной и контактной групп.

Ежедневно с 1 по 14 сутки после инфицирования брали общие оральные и клоакальные смывы у цыплят каждой из трех групп. Присутствие вируса в пробах определяли методом ОТ-ПЦР. На 7, 10, 14, 21 и 28 сутки отбирали сыворотки крови от каждого цыпленка и исследовали на наличие вирусоспецифических антител иммуноферментным методом.

Эксперимент № 2. В эксперименте №2 участвовало три группы цыплят, разделенные по аналогии с экспериментом №1. В состав опытной и контактной групп входило по 12 цыплят, контрольной – 6 цыплят. На 3, 6, 10, 14, 18 и 21 сутки после инфицирования проводили вынужденный убой 2 цыплят из опытной, 2 цыплят из контактной и 1 цыпленка из контрольной групп.



а



б

Рис. 1. Трахеальная органная культура, зараженная (а) и незараженная (б) изолятом метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07

При патологоанатомическом исследовании отмечали изменения, характерные для метапневмовирусной инфекции. В каждой группе цыплят отдельно отбирали пробы трахеи, легких, тканей носовых полостей, а также общую пробу внутренних органов (печени, почек, селезенки, кишечника, бурсы). Все пробы исследовали на наличие генома метапневмовируса птиц в ОТ-ПЦР.

В обоих экспериментах вели наблюдение за клиническими проявлениями заболевания, отмечая изменения в состоянии и поведении птиц опытной и контактной групп по сравнению с птицей контрольной группы.

Обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Суммарную РНК из проб выделяли, используя набор реактивов для выделения РНК («Биоком», Россия) в соответствии с инструкцией.

Синтез комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса миелобластоза птиц AMV-revertase (Promega, США). Для проведения обратной транскрипции к реакционной смеси, содержащей 1 мкл 10 пМ праймера G6-, 2 мкл 10 мМ dNTP, 4 мкл 5х ревертазного буфера и 1 ед. AMV-revertase, добавляли 13 мкл раствора суммарной РНК. Смесь перемешивали, инкубировали 40 мин при 42° С, затем прогревали 3 мин при 96° С.

ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). В пробирку объемом 0,5 мл вносили 3 мкл раствора кДНК и 22 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл 10 пМ праймеров G1+ и G6-, 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 5х буфера для ПЦР, 2,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 0,25 мкл 500 ед. Taq ДНК-полимеразы («Promega», США), 11,5 мкл воды. Сверху наслаивали 25 мкл минерального масла. Проводили 35 циклов амплификации при следующих режимах: 94° С – 30 с; 50° С – 30 с; 72° С – 50 с.

Для повышения чувствительности реакции проводили второй этап амплификации – nested-ПЦР с внутренними праймерами G5- и G9+. Праймеры рассчитаны Cavanagh и соавт. (14). Реакционную смесь для nested-ПЦР составляли по аналогии с первой реакцией. Проводили 25 циклов амплификации при следующих температурных режимах: 94° С – 30 с; 55° С – 30 с; 72° С – 40 с.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Рассчитанная длина специфического фрагмента ДНК после первой реакции амплификации составляет 444 пары нуклеотидов (п.н.), после nested-ПЦР – 361 п.н.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Специфические антитела к метапневмовирусу птиц в сыворотках крови обнаруживали в блокирующем варианте ИФА с использованием коммерческого набора фирмы «SVANOVA» (Швеция) в соответствии с инструкцией. Показателем уровня антител служил процент ингибиции (percent inhibition, PI). При значениях PI>40 результат оценивали как положительный, при PI 30-40 – как сомнитель-

Таблица 1

Результаты выявления метапневмовируса птиц в оральных смывах

Группа \ Сутки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Опытная	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Контактная	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Контрольная	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ – геном метапневмовируса птиц выявлен;
- – геном метапневмовируса птиц не выявлен

Таблица 2

Результаты выявления метапневмовируса птиц в органах респираторного тракта

Группа	Проба \ Сутки	3	6	10	14	18	21
Опытная	Трахея	+	+	-	-	-	-
	Ткани носовых полостей	+	+	-	-	-	-
	Легкие	-	-	-	-	-	-
Контактная	Трахея	-	+	-	-	-	-
	Ткани носовых полостей	+	+	+	-	-	-
	Легкие	-	-	-	-	-	-
Контрольная	Трахея	-	-	-	-	-	-
	Ткани носовых полостей	-	-	-	-	-	-
	Легкие	-	-	-	-	-	-

+ – геном метапневмовируса птиц выявлен;
- – геном метапневмовируса птиц не выявлен

ный, и при PI<30 – как отрицательный.

Результаты и обсуждение

В мае 2007 г. в лабораторию молекулярной диагностики болезней птиц ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» поступил патологический материал из птицефабрики Калужской области. Среди поголовья данного хозяйства у цыплят-бройлеров в возрасте 20-30 суток наблюдали признаки респираторного заболевания: общее угнетенное состояние, чихание, хрипы, конъюнктивиты и синуситы.

Из внутренних органов (трахеи, легких) методом ОТ-ПЦР был выявлен метапневмовирус птиц подтипа B. Отсутствие в материале других инфекционных агентов, способных вызывать респираторные нарушения (вирусов ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита и микоплазмы галлисептикум), также было показано в ПЦР.

Для выделения вируса использовали 20% суспензию трахеи и легких, приготовленную на ФБР (pH 7,4). Патогенное действие вируса проявлялось в округлении эпителиальных клеток трахеи и снижении их двигательной активности. Пораженные вирусом клетки постепенно отслаивались и накапливались в просвете трахеи, затрудняя доступ питательных веществ к еще функционирующим клеткам (рис. 1а). Цилиостатическое действие изолят метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07 начал проявлять после 3 пассажа, вызывая полную остановку мерцательного движения клеток трахеи на 9 сутки инкубации. Свободные от вируса контрольные срезы трахеи сохраняли жизнеспособность до 14 суток.

При экспериментальном воспроизведении метапневмовирусной инфекции в лаборатории невозможно учесть все факторы, влияющие на развитие клинической картины у птиц в условиях птицефабрики. Встречающиеся в птицеводческих хозяйствах нарушения условий содержания птиц (температурного режима, влажности, воздухообмена), повышенная плотность посадки птиц способствуют распространению и усилению тяжести вызываемого метапневмовирусом птиц заболевания. Размножение вируса в клетках эпителия верхних отделов респираторного тракта птицы приводит к остановке их согласованного движения, направленного на механическое удаление из дыхательных путей попавших с воздухом потенциально опасных частиц (в том числе бактерий). При этом создаются благоприятные условия для разви-

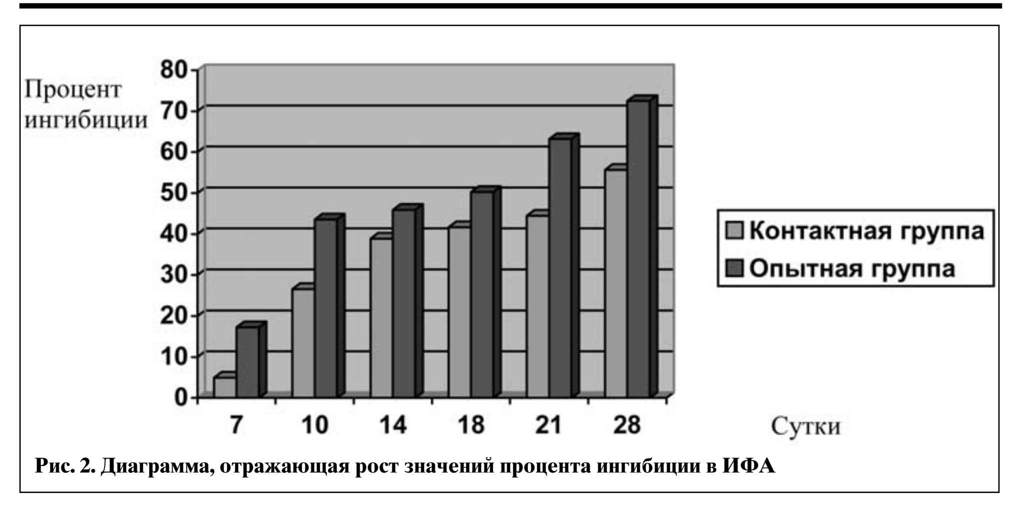


Рис. 2. Диаграмма, отражающая рост значений процента ингибиции в ИФА

тия патогенных микроорганизмов, способных значительно осложнить течение заболевания, изначально вызванного метапневмовирусом. Наиболее часто в роли вторичных патогенов выступают *Mycoplasma sp.*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp.*, *Bordetella avium*, *Ornitobacterium rhinotracheale* и другие [6, 7, 9, 20].

В экспериментах №1 и №2 у птиц опытной и контактной групп наблюдали проявление симптомов респираторного заболевания. На 3-6 сутки после инфицирования отмечали развитие легких ринитов у цыплят опытных групп (мутные пенистые выделения из ноздрей при легком надавливании). У некоторых птиц, как в опытных, так и в контактных группах, наблюдали конъюнктивиты и незначительное опухание инфраорбитальных синусов, появляющиеся на 6-7 сутки и практически исчезающие на 14-15 сутки после инфицирования. У большинства цыплят обеих групп глазная щель была сужена. У птиц контрольных групп отклонений от нормы выявлено не было.

Результаты выявления метапневмовируса птиц методом ОТ-ПЦР в оральных смывах цыплят, участвовавших в эксперименте №1, представлены в табл. 1. В клоакальных смывах вирус обнаружен не был.

Результаты выявления вируса методом ОТ-ПЦР в пробах респираторных органов в эксперименте №2 представлены в табл. 2. В пробах других внутренних органов (печени, почек, селезенки, кишечника, бурсы) вирус не был обнаружен.

Полученные результаты соответствуют данным литературных источников, отмечающих тропизм вируса к тканям верхних дыхательных путей [4, 8, 12, 17, 19].

Вирусоспецифические антитела выявляли в сыворотках птиц опытной группы, начиная с 10 суток после инфицирования, контактной группы – с 18 суток. Динамика возрастания значений процента ингибиции и, соответственно, титров антител к метапневмовирусу птиц у цыплят опытной и контактной групп, отражена на рис. 2. У цыплят контрольной группы антител к метапневмовирусу птиц выявлено не было.

Изучение спектра метапневмовирусов птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации, имеет не только научное, но и практическое значение. Данные о биологических свойствах и принадлежности выделяемых изолятов вируса к тому или иному подтипу могут быть использованы при разработке и совершенствовании методов диагностики и специфической профилактики метапневмовирусной инфекции птиц.

Выводы

В представленной работе изучены биологические свойства изолята метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07, выделенного в Калужской области в 2007 г. Показана способность данного изолята метапневмовируса птиц вызывать поражение органов дыхания восприимчивой птицы при отсутствии коинфицирования другими вирусами или бактериями. Продемонстрирована возможность горизонтального распространения инфекции. Экспериментально инфицированные цыплята выделяли вирус со 2 по 7 сутки. Репродукция вируса происходила в тканях верхних дыхательных путей (в слизистой носовой полости и трахее). Специфические антитела к вирусу выявляли в реакции ИФА, начиная с 10 суток после инфицирования.

РЕЗЮМЕ

Изучены биологические свойства изолята метапневмовируса птиц aMPV/B/2-07, выявленного у цыплят-бройлеров в 2007 г. Выделение вируса проводили на трахеальной органной культуре. Вируссодержащий материал вводили цыплятам интраназально, орально и в конъюнктивальный мешок. У птиц наблюдали признаки поражения органов дыхания. У зараженных цыплят вирус выявляли методом ОТ-ПЦР в оральных смывах на 2-7 сутки, в тканях носовых ходов и трахеи на 3, 6 сутки после инфицирования. У находящихся с ними в контакте незараженных цыплят – в оральных смывах на 4-10 сутки, в тканях носовых полостей и трахеи – на 3, 6, 10 сутки после инфицирования.

SUMMARY

Biological characteristics of avian metapneumovirus isolate aMPV/B/2-07, collected from chick-broilers in 2007, were studied. The virus was isolated in tracheal organ culture. The virus-containing material was administered in chicks by intranasal, oral routes and into a conjunctival sac. Birds demonstrated respiratory organ affection. The virus was detected in infected chicks by the RT-PCR in oral swabs in 2-7 days, in tissues of nasal passages in 3, 6 days following infection. In in-contact non-affected chicks the virus was identified in oral swabs in 4-10 days, in tissues of nasal passages and trachea in 3, 6, 10 days following infection.

Литература

1. Условия получения трахеальной органной культуры куриных эмбрионов для выделения и типирования вируса инфекционного бронхита кур / О. А. Чупина, С. В. Фролов, В. И. Диев, А. В. Борисов // Сибирская язва и др. опасные инфекц. болезни жив-х: Матер. по теме работы круглого стола, приуроченного к 80-летию академика РАСХН Бакулова И. А. – Покров, 2005. – С. 225-227.
2. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies / J. K. A. Cook, B. V. Jones, M. M. Ellis [et al.] // Avian Pathol. 1993. Vol. 22. P. 257-273.
3. Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia Coli at different time intervals / A. R. Al-Ankari, J. M. Bradbury, C. J. Naylor [et al.] // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 257-267.
4. Avian pneumovirus infection in Minnesota turkeys: experimental reproduction of the disease / F. F. Jirjis, S. L. Noll, D. A. Halvorson [et al.] // Avian Dis. 2000. Vol. 44. P. 222-226.
5. Cook, J. K. A. Avian rhinotracheitis / J. K. A. Cook // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2000. Vol. 19, № 2. P. 602-613.
6. Cook, J. K. A. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria / J. K. A. Cook, M. M. Ellis, M. B. Huggins // Avian Pathol. 1991. Vol. 20. P. 155-166.
7. Exacerbation of Mycoplasma gallisepticum infection in turkeys by rhinotracheitis virus / C. J. Naylor, A. R. Al-Ankari, A. I. Al-Afaleq [et al.] // Avian Pathol. 1992. Vol. 21. P. 295-305.
8. Experimental and serologic observations on Avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys / B. Panigrahy, D. A. Senne, J. C. Pedersen [et al.] // Avian Dis. 2000. Vol. 44. P. 17-22.
9. Experimental infection in turkeys and chickens with Ornitobacterium rhinotracheale / P. V. Empel, H. V. D. Bosch, D. Goovaerts, P. Storm // Avian Dis. 1996. Vol. 40. P. 558-564.
10. Experimental infections of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus / R. Gough, M. S. Collins, W. J. Cox, N. J. Chettle // Vet. Rec. 1988. Vol. 123. P. 58-59.
11. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck / D. Toquin, M. H. Bayцn-Auboyer, N. Eterradossi [et al.] // Vet. Rec. 1999. Vol. 139. P. 71-72.
12. Jones, R. C. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered / R. C. Jones // Avian Pathol. 1996. Vol. 25. P. 639-648.
13. Juhasz, K. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups / K. Juhasz, A. J. Easton // J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75. P. 2873-2880.
14. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions / D. Cavanagh, K. Mawditt, P. Britton, C. J. Naylor // Avian Pathol. 1999. Vol. 28. P. 593-605.
15. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup / M. H. Bayцn-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Eterradossi // J. Gen. Virol. 2000. Vol. 81. P. 2723-2733.
16. Pathogenesis of Avian pneumovirus infection in turkeys / F. F. Jirjis, S. L. Noll, D. A. Halvorson et al. // Vet. Pathol. 2002. Vol. 39. P. 300-310.
17. Pathogenicity, transmissibility, and tissue distribution of Avian pneumovirus in turkey poults / A. N. Alkhalaf, L. A. Ward, R. N. Dearth, Y. M. Saif // Avian Dis. 2002. Vol. 46. P. 650-659.
18. Seal, B. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains / B. Seal // Virus Res. 1998. Vol. 58. P. 45-52.
19. The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of chicken isolate of avian pneumovirus in chickens / E. Catelli, J. K. A. Cook, J. Orbell [et al.] // Avian Pathol. 1998. Vol. 27. P. 632-640.
20. Turkey rhinotracheitis virus and Escherichia coli experimental infection in chickens: histopathological, immunocytochemical and microbiological study / N. Majo, X. Gibert, M. Vilafranca [et al.] // Vet. Microbiol. 1997. Vol. 57. P. 29-40.